

## **Gazdanövénykört és betegségtüneteket meghatározó vírusgének analízise, különös tekintettel a cucumovírusokra**

A növényi vírusok és a növények között kialakuló kapcsolat eredményét számos tényező befolyásolja. A fertőzéshez vírusvektorok vagy mechanikai sérülés szükséges, majd a vírusoknak replikálódniuk kell a fertőzött sejtekben. A szomszédos szövetekbe átjutva lokális fertőzés kialakítása után a növény távolabbi részeibe a szállítószöveten keresztül eljutva szisztemikus vírusfertőzés alakulhat ki. A vírus jelenléte még mindig nem jelenti minden esetben tünetek megjelenését. A vírusfertőzés egész folyamata és a tünetek kialakulása a vírus és a gazdanövény folyamatos kölcsönhatásának eredménye, ami nagymértékben változhat a fertőzött növényfaj illetve egy vírus különböző izolátumainak a függvényében is. Még napjainkban is igen korlátozottak az ismereteink a vírusok által indukált tünetek vírusszerkezeti magyarázatáról, valamint a növényi oldalon a kölcsönhatásban érintett fehérjéről is.

Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) a Cucumovirus nemzetségbe tartozik. Egyike a legszélesebb gazdanövénykörrel rendelkező, változatos tüneteket mutató, komoly gazdasági károkat okozó vírusoknak, míg az ugyanebbe a nemzetségbe tartozó paradicsom magtalanság vírus (*Tomato aspermy virus*, TAV) és földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*, PSV) lényegesen szűkebb gazdanövénykörrel és gazdasági jelentőséggel rendelkezik. Jól ismert példa erre a különbségre az uborka fertőződése, melyet a CMV szisztemikusan fertőz, míg a TAV csak sejtszinten képes replikálódni így sem sejtről-sejtre, sem hosszútávú terjedésre nem képes. A sejtről-sejtre terjedés belső különbségeiért ebben az esetben az RNS 1, 2, míg a hosszútávú mozgásbeli eltérésekért a köpenyfehérje felelős.

Homológia modellezéssel három CMV izolátum (Trk7, R, M) köpenyfehérje szerkezeti modelljét készítettük el, majd ezeknek a modelleknek a felhasználásával értelmeztük azt, hogy a köpenyfehérje egy-egy aminosavának változás miatt okozhat jelentős változásokat a tünetek fenotípusában illetve a gazdanövénykörben. A CP térszerkezet és a tünetek összefüggéseit vizsgálva elmondhatjuk hogy a 129-es aminosavval kezdődő  $\beta$ E- $\alpha$ EF hurok mozgékonyságának döntő szerepe van a tünetek kialakításában, bár önmagában ez a jellemző nem meghatározó. Továbbá minden vizsgált mutáció esetén a jósolt foszforilációs hely változása következik be, így valószínűsíthető hogy a köpenyfehérje foszforilációjának döntő szerepe van a gazdanövény válaszreakciójában (Salánki és mtsai, 2006).

A cucumovírusok hosszútávú mozgásában szerepet játszó vírusfaktorok vizsgálatához az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) köpenyfehérjéjének 5 felszíni hurkát paradicsom magtalanság vírus (*Tomato*

aspermy virus, TAV) megfelelő hurkaira cseréltük fertőzőképes klónok felhasználásával. A rekombináns köpenyfehérjét hordozó RNS 3 fertőzőképes transzkriptumokkal RNS 1 és RNS2 transzkriptumok jelenlétében *N. clevelandii* növényeket, a két vírus közös, szisztémikus gazdanövényét fertőztünk. A szisztémikus vírustüneteket minden esetben megfigyeltük 5-8 nappal az inokulálás után, majd RT/PCR módszerrel és a PCR termékek nukleinsav sorrendjének meghatározásával bizonyítottuk a mutációk tartós jelenlétét a vírusokban. A rekombináns vírusok tisztítása 4 esetben sikeres volt a hagyományos eljárással, azonban a TAV 2. hurkát hordozó CMV ezzel a módszerrel nem tisztítható. Ezt a rekombináns vírust a paradicsom magtalanság vírusra leírt módszerrel sikerült tisztítanunk. A tisztított virionokkal uborka növényeket fertőztünk, és megállapítottuk hogy a TAV 2-es ( $\beta$ D- $\beta$ E), 3-as ( $\beta$ E- $\alpha$ EF), 4-es ( $\beta$ F- $\beta$ G) és 5-ös ( $\beta$ H- $\beta$ I) hurka jelenlétében a rekombináns vírus képes szisztémizálódni bár eltérő hatékonysággal, míg az 1-es ( $\beta$ B- $\beta$ C) hurok esetén szisztémikus mozgást nem figyeltünk meg. A  $\beta$ B- $\beta$ C hurok részletes vizsgálata során három aminosavára (78-Pro, 79-Glu, 80-Ile) sikerült lokalizálnunk azt a régiót, melyet TAV eredetűre cserélve a vírus elvesztette szisztémikus mozgásának képességét. Egy mutáció (78 Pro) nem csak a szelektív gazdanövényen, az uborkán okozta a szisztémikus mozgás megszűnését, hanem a két vírus közös gazdanövényein is. Ha az érintett három aminosavat együttesen cseréltük ki (78-80 Pro, Glu, Ile), a mutáns vírus továbbra is szisztémikusan fertőzte a közös gazdanövényeket, azonban az uborkát csak lokálisan fertőzte. Ezekből a kísérletekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a köpenyfehérjének ezen régiójának a cucumovírusok szisztémikus mozgásában kulcsszerepe van. Következő lépésként a TAV fertőzőképes klónjaiba építettük mind az öt loop szakaszt, illetve a  $\beta$ B- $\beta$ C hurokban pontmutánsokat is készítettünk (T376K, T378P, T379E, T380I, T383G), valamint a három egymást követő mutációt együttesen is a T3 klónba építettük (T3:78-80PEI). Ezekkel a mutánsokkal először a két vírus közös gazdanövényeit fertőztük (*Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*). A teljes hurok cserét hordozó mutánsok közül egyedül a  $\beta$ H- $\beta$ I hurok esetén tudtunk szisztémikus fertőzést kimutatni és viriont tisztítani, majd RNS kivonás és cDNS/PCR amplifikálás után megállapítottuk hogy a mutáció stabil. A pontmutációk közül a T376K, T383G és a T3:78-80PEI bizonyult szisztémikus mozgásra képesnek és stabilnak. Ezeket a mutánsokat is tisztítottuk, majd uborka növényeket fertőztünk. Az uborka növényeken a TAV szisztémikus mozgásának kialakításához nem volt elég ezeknek a régióknak a cseréje. A hurok cserét hordozó mutánsok valószínűleg a mozgási fehérjével való inkompatibilitás miatt nem szisztémizálódtak. Korábbi munkánk során (Salánki et al. 2004) leírtuk hogy a CMV mozgási fehérjével ellentétben a TAV mozgási fehérjeje nem képes a vírus sejtről-sejtre terjedését a másik cucumovírus köpenyfehérjeje jelenlétében támogatni. Jelen konstrukcióink

lehetőséget adnak ennek az inkompatibilitásért felelős régiónak a finomabb térképezésére (Salánki és mtsai. 2008).

Ugyanebbe a vírusnemzetségbe tartozó harmadik vírust, a földimogyoró satnyulás vírust (peanut stunt virus, PSV) is be kívántuk vonni a vizsgálatokba, így a vírust Gödöllőn akác növényről izoláltuk. A tisztított vírus mindhárom genomi RNS-ét klónoztuk és teljes nukleinsav sorrendjét meghatároztuk (GeneBank AccNo: AM905353, AM905354, AM905355). Megállapítottuk, hogy nukleinsav sorrendje jelentősen eltér a már ismert izolátumokétól (80,9-84% azonosság), így a PSV izolátumok egy új alcsoportját azonosítottuk. Az RNS3-ban két rekombinációs pontot is azonosítottunk, így ennek az izolátumnak a nukleinsav sorrendje bizonyítja a rekombináció szerepét cucumovírusok evolúciójában (Kiss és mtsai 2008). Az RNS 3 esetén a klón fertőzőképesnek bizonyult, így a Trk-7 CMV fertőzőképes klónjait felhasználva rekombináns vírusokat készítettünk. Megállapítottuk hogy a CMV mozgási fehérjét és PSV köpenyfehérjét hordozó vírus nem stabil. Bár inokulált *N. clevelandii* növényeknek mind az inokulált mind a szisztemikus leveleiből kimutatható volt a rekombináns vírus, sem mechanikai átvitele nem volt sikeres, sem a vírustisztítás nem vezetett eredményre.

Az a reasszortáns vírus mely a TAV egyes és kettes RNS-e mellett a CMV hármas RNS-ét hordozza, az eredeti vírusokénál súlyosabb tüneteket alakít ki *Nicotiana benthamiana* növényeken. Az új génkombináció kialakulása feltehetően olyan kölcsönhatások alakulnak ki a TAV 1-es és 2-es RNS-én kódolt valamely fehérje illetve a CMV 3-as RNS-én kódolt fehérjék között, mely a szülői vírusoknál súlyosabb tüneteket eredményez. Munkánk során a TR rekombináns vírus segítségével a CMV köpenyfehérjéjére lokalizáltuk a törpülésért felelős régiót az RNS3 esetén. A CMV 2b fehérjéjét sikerült a TAV RNS2-be építenünk, és ennek felhasználásával megállapítottuk hogy az RNS 12 esetén nem a 2b fehérje az erős tünetek okozója.

A CMV Ns izolátuma hiperszenzitív reakciót (HR) okoz *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc és *Nicotiana glutinosa* növényeken. A HR kialakulásáért felelős genetikai determinánsst korábbi munkánk során az 1a fehérje 461. aminosavára lokalizáltuk (Divéki és mtsai. 2004). Az 1a fehérje szerkezet részleges számítógépes modellezése után a 461. pozíció elicitor funkcióját vizsgáltuk. Molekuláris modellezéssel hét mutációt terveztünk, amit fertőzőképes klónok felhasználásával építettünk be a CMV genomjába. A mutációk közül három (prolin, glutaminsav, aszparagin) gátolta a vírus replikációját. Két mutációt hordozó vírus (lizin, arginin) szisztemikus tüneteket indukált. Az alanint illetve szerint tartalmazó mutánsok esetén a vírus lokalizációját figyeltük meg, de az Ns-CMV izolátumnál megfigyelt erős nekrotikus tünetek nem jelentek meg. Amennyiben a vírusfertőzéshez extrém magas koncentrációban használtunk tisztított viriont, az Ns-CMV esetén szisztemikus tüneteket figyeltünk meg. A szerint tartalmazó mutáns vírus esetén szintén megfigyeltük a vírust nem

fertőzött levelekben, bár csak a csúcsi levelek kisebb szegmenseiben. Az alanint kódoló mutáns vírust a nem fertőzött levelekben soha nem detektáltuk (Salánki és mtsai 2007).

Salánki K., Gellért Á., Balázs E. (2006): Az uborka mozaik vírus változékonysága a köpenyfehérje-szerkezet tükrében. *Növényvédelem*, 42(1):15-22.

Kiss L., Sebestyén E., László E., Salamon P., Balázs E. és Salánki K. (2008): Nucleotide sequence analysis of peanut stunt virus Rp strain suggests the role of homologous recombination in cucumovirus evolution. *Archives of Virology* 153(7):1373-7

Salánki K, Gellért A, Náray-Szabó G, Balázs E. (2007): Modelling-based characterization of the elicitor function of amino acid 461 of cucumber mosaic virus 1a protein in the hypersensitive response. *Virology* 358:109-117

Salánki Katalin, Kiss László, Gellért Ákos és Balázs Ervin (2008): Identification of a region of *Tomato aspermy virus* (TAV) coat protein responsible for long-distance movement deficiency in cucumber XIVth International Congress of Virology, Istambul, 2008 augusztus 10-15.